

BI

① RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

⑪ N° de publication : 2 651 132  
(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

⑫ N° d'enregistrement national : 90 00935

⑬ Int Cl<sup>8</sup> : A 61 K 35/78, 31/35

⑫ DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

⑭ Date de dépôt : 26.01.90.

⑮ Priorité : 30.08.89 KR 8912435; 31.08.89 KR 8912493; 31.08.89 KR 8912492.

⑯ Date de la mise à disposition du public de la demande : 01.03.91 Bulletin 91/09.

⑰ Liste des documents cités dans le rapport de recherche : Le rapport de recherche n'a pas été établi à la date de publication de la demande.

⑱ Références à d'autres documents nationaux apparentés :

⑲ Demandeur(s) : Société dite: Pacific Chemical Co., Ltd — KP.

⑳ Inventeur(s) : Park Soo Nam et Boo Yong Chool.

㉑ Titulaire(s) :

㉒ Mandataire : Société de Protection des Inventions.

㉓ Agents de protection des cellules contre les espèces chimiques à oxygène actif et leur préparation.

㉔ La présente invention concerne des agents de protection des cellules contre des espèces chimiques à oxygène actif qui sont utiles comme constituants de cosmétiques et peuvent être préparés à partir de l'extrait total ou purifié de matières végétales, par exemple, des feuilles de *Camellia sinensis* L., des racines d'*alpinia officinarum* Hance et des racines de *Scutellaria baicalensis* Georgi contenant des flavonoïdes biochimiquement actifs tels que le gallate de (-)-épigallocatechine, la galangine ou la baicaléine comme constituant principal, et contenant ces flavonoïdes en grandes quantités.

FR 2 651 132 - A1



AGENTS DE PROTECTION DES CELLULES CONTRE LES ESPECES  
CHIMIQUES A OXYGENE ACTIF ET LEUR PREPARATION

La présente invention concerne des agents de protection des cellules contre les espèces chimiques à oxygène actif. Les agents de protection des cellules contiennent des flavonoïdes biochimiquement actifs et ils sont supposés être utilisables comme constituants de cosmétiques.

Les espèces chimiques à oxygène actif sont connues pour provoquer une dégradation des cellules, des mutations, le cancer et le vieillissement par peroxydation des lipides, dégradation des protéines, altération des acides nucléiques etc. (Leibovitz, B.E. et Siegel B.W. (1980), J. Gerontol., 35,45; Foote, C.S. (1982) "Pathology of Oxygen" (A.P. Autor, éd.) Academic Press, N.Y., 21; Straight, R.C. et Spikes, J.D. (1985), "Singlet Oxygen, vol.IV, Reaction Modes and Product, Part 2" (Frimer, A.A. éd.).

Les espèces chimiques à oxygène actif peuvent comprendre l'oxygène singulet, le radical hydroxyle, le radical anion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène, etc., et de nombreuses études sont en cours sur les composés chimiques et enzymes capables de les inactiver ou de les piéger.

Il a déjà été indiqué précédemment que le  $\beta$ -carotène (Foote, C.S. et Denny, (1968), J. Am. Chem. Soc., 90,6233) ou l' $\alpha$ -tocophérol (Fahrenholtz, S.R. et Doleiden, F.H. (1974), Photochemistry and photobiology, 20, 505-509) présente une activité d'inactivation efficace contre l'oxygène singulet qui a une grande importance biologique pour les cellules de la peau fréquemment exposées à la lumière solaire.

Comme capteurs du radical hydroxyle qui sont connus pour être les plus réactifs vis-à-vis des espèces chimiques à oxygène actif, on peut citer par

exemple le mannitol (Martin, J.P. et Logsdon, N. (1987), J. Biol. Chem. 262, 15, 7213-7219), le tryptophane, le formiate, le t-butanol, l'éthanol (Bors, W. et Michel, C. (1977) Eur. J. Biochem., 95, 621-627) etc., tandis  
5 que des études sur la superoxyde dismutase, une enzyme de l'organisme vivant transformant le radical anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène et sur la catalase ou la glutathion peroxydase, une enzyme de l'organisme  
10 vivant décomposant le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène sont activement poursuivis en relation avec le vieillissement des cellules (Hans Nohl et Dietmar Hegner (1979), Mechanisms of Ageing and development, 11,145-151).

Ces dernières années, certains types de  
15 flavonoïdes présents dans les matières végétales utilisées pour le traitement de maladies très diverses depuis les temps anciens se sont révélés réagir avec diverses espèces chimiques à oxygène actif, à savoir l'oxygène singulet (Sorata, Y., Takahama, U. et Kimura, M. (1984), Biochem, Biophys. Acta. 799,31; Matuura, T.,  
20 Matsushima, H., Nakashima, R. (1970), Tetrahedron, 26,435; Takahama, U., Youngman, R.J., Elsther, E.F. (1984), Photobiochem. Photobiophys, 7,175-181), le radical anion superoxyde (Baumann, J., Wurm, G. et Bruchhausen, F.V. (1980), Arch. Pharm. 313,330), le  
25 radical hydroxyle (Nasr, C., Pincemail, J., Brasseur, T. Deby, C., Haag, M., Angenot, L., Anton, R. (1987), Ind. Int. Symp. on Plant Flavonoids in Biology and medicine, p69, Husain, S.R., Cillard, J. et Cillard, P. (1987),  
30 Phytochemistry, 26,2489), et le peroxyde d'hydrogène (Barz, W., Wiermann, R. (1981) dans Proc. Int. Bioflavonoid Symp., pp185, Barz, W., Koster, J., Weltring, K.M., tractk, D. (1985), Ann. Proc. Phytochem. Soc. Eur., 25,307; Miller, E., Schreier, P. (1985),  
35 Food Chem. 17,143).

En outre, en ce qui concerne les flavonoïdes, l'activité de piégeage des radicaux libres (Wolf Bors et Manfred Saran (1987), Free Rad. Res. Comms., vol.2, n°4-6, 289-294) et l'activité de répression de la peroxydation des lipides (Younes, M., Siegers, C.P. (1981) Planta Medica, 43, 240) ont déjà été étudiées et on a également étudié l'activité inhibitrice pour une enzyme oxydante de l'organisme vivant telle que la lipoxygenase etc. (Baumann, J., Bruchhausen, F.V. et Wurm, G. (1980), Prostaglandins, vol.20, n°4, 627).

Cependant, malgré les nombreuses études précitées, les flavonoïdes n'ont pas pu être utilisés dans la pratique comme agents de protection des cellules contre les espèces chimiques à oxygène actif, car ces études :

- 1) concernant pour la plupart uniquement la réaction physicochimique ; ou
- 2) n'ont pas pu s'écarter du niveau enzymatique même dans le cas du traitement de la réaction biochimique ; ou
- 3) n'ont pas pu expliquer le mécanisme même si leur efficacité plus ou moins élevée en clinique est reconnue.

Dans ces conditions, une conséquence inévitable a été que des méthodes expérimentales quantitatives et significatives du point de vue biochimique et biologique n'ont pas été mises au point.

La demanderesse a porté son attention sur le fait que si l'on mettait au point des méthodes expérimentales quantitatives et significatives du point de vue biochimique-biologique, les flavonoïdes seraient utilisables comme agents de protection des cellules contre les espèces chimiques à oxygène actif car les flavonoïdes ont une grande utilité en raison de leurs diverses activités résultant de leurs structures

variées et de leurs teneurs élevées dans les matières végétales. Partant de ce fait, la demanderesse a essayé dans un premier stade de mettre au point et d'établir les méthodes expérimentales, et elle a effectué dans un  
5 second stade des études quantitatives au moyen des méthodes expérimentales ainsi obtenues.

Par conséquent, la présente invention fournit une méthode expérimentale quantitative et efficace du point de vue biochimique et biologique nécessaire pour  
10 le développement d'agents protecteurs des cellules contre les espèces chimiques à oxygène actif, elle choisit des flavonoïdes présentant l'effet le plus prononcé au moyen de la méthode ainsi obtenue et elle interprète le mécanisme de l'activité ; en conséquence,  
15 la présente invention est précieuse pour permettre l'utilisation pratique des agents protecteurs des cellules contenant des flavonoïdes biochimiquement actifs.

La présente invention concerne un procédé  
20 pour mesurer quantitativement l'activité de protection des cellules des flavonoïdes contre les espèces chimiques à oxygène actif au moyen d'une expérience de photohémolyse des érythrocytes significative du point de vue biochimique-biologique.

L'expérience de photohémolyse des érythrocytes a été effectuée pour interpréter le mécanisme de l'hémolyse par les espèces chimiques à oxygène actif ou par la lumière (Epiling, G.A. et Sibley, M.T. (1987), Photochem. Photobiol., 46,39;  
25 Lamola, A.A. et Doleidon, F.H. (1980), Photochem. Photobiol., 31,597, Valenzano, D.P. (1984) Photochem. Photobiol., 40,681), mais elle n'a pas été utilisée dans une expérience quantitative, car divers facteurs influants sur cette expérience n'ont pas été  
30 suffisamment pris en considération. La demanderesse a  
35

supposé que si les conditions expérimentales permettant une mesure quantitative et significative du point de vue biochimique-biologique étaient établies, l'expérience ci-dessus serait plus simple que  
5 l'expérience sur l'animal et pourrait fournir des informations très utiles en peu de temps. Elle a poursuivi les études pour aboutir à la présente invention.

Comme conséquence des études sur les effets  
10 de divers flavonoïdes en utilisant la méthode expérimentale de photohémolyse des érythrocytes mise au point, les faits nouveaux suivants ont été établis :

1) En plus de la réaction de dégradation physico-chimique directe par les espèces chimiques à  
15 oxygène actif, une réaction biochimique secondaire est responsable de la photohémolyse des érythrocytes.

2) Les flavonoïdes peuvent être classés en plusieurs groupes, à savoir un groupe réagissant directement par voie physico-chimique avec les espèces  
20 chimiques à oxygène actif (myricétine, quercétine, etc.), un groupe agissant principalement dans le stade de réaction biochimique secondaire (galangine, kaempférol, etc.) et un groupe agissant dans les deux stades ((-)-épigallocatechine, baicaléine).

3) Lorsque des flavonoïdes agissant respectivement dans des stades différents ont été  
25 traités ensemble, l'activité a été augmentée d'une manière synergique.

4) Parmi les flavonoïdes essayés le gallate  
30 de ((-)-épigallocatechine a présenté une forte activité dans les deux stades et la galangine a présenté d'une manière surprenante une activité particulièrement forte dans le stade de la réaction biochimique secondaire.

La demanderesse a choisi les matières  
35 végétales contenant les flavonoïdes biochimiquement

actifs en grandes quantités de la manière décrite ci-après en vue de mettre au point les agents protecteurs des cellules contre les espèces chimiques à oxygène actif en appliquant les résultats de l'étude ci-dessus, et elle a préparé des agents protecteurs des cellules à partir des extraits.

1) *Camellia sinensis* L., gallate de (1)-épigallocatechine (teneur : 8% des feuilles sèches).

2) *Alpinia officinarum* Hance ; (galangine teneur : 1% dans les racines sèches).

3) *Scutellaria baicalensis* Georgi ; baicaléine et ses glycosides (teneur 3% dans les racines sèches).

Le procédé de préparation de la solution contenant l'extrait total est le suivant : le procédé est caractérisé en ce qu'on extrait les matières végétales sèches avec de l'eau ou une solution aqueuse d'éthanol, de propylèneglycol, de butylèneglycols ou de glycérols, en ce qu'on ajoute de l'eau ou une solution aqueuse de butylèneglycols, de glycérol à la solution contenant l'extrait et en ce qu'on la fait vieillir dans une chambre froide. Cette solution peut être utilisée elle-même comme agent de protection des cellules.

La description détaillée et le procédé de préparation de l'extrait purifié seront donnés dans les exemples ci-dessous.

Essai 1 : Mesure de l'activité de protection des cellules des flavonoïdes contre les espèces chimiques à oxygène actif.

#### 1) Préparation des échantillons

Divers flavonoïdes, à savoir la galangine, le gallate de (-)-épigallocatechine (EGCG), la quercétine, le kaempférol, la myricétine, la 3-hydroxyflavone, la rutine, l'apigénine, la chrysine, l'acacétine, la

baicaline, la flavone, la 7,8-benzoflavone, la (-)-  
épicatechine, la (+)-catéchine, la silybine, la  
dihydrorobinétine, la taxifoline et l'aromadendrine et,  
comme témoin, l' $\alpha$ -tocophérol (chacun 4 mmoles) ont été  
5 dissous dans 1,0l d'éthanol pour obtenir des  
échantillons.

## 2) Mesure

Du sang prélevé sur un lapin a été centrifugé  
à 3 000 tours/min. pendant 5 minutes et lavé pour  
10 obtenir des érythrocytes qui ont été dilués dans du  
sérum physiologique pour préparer une suspension  
d'érythrocytes (érythrocytes  $6 \times 10^7$  / 3,5 ml). Six tubes à  
essais en Pyrex de 10 ml de 1,0 cm de diamètre ont été  
préparés, et l'on a introduit dans chacun d'eux 3,5 ml  
15 de la suspension. Trois des six tubes à essais ont été  
pris comme groupe témoin, et on leur a ajouté  
respectivement 50  $\mu$ l d'éthanol. Les trois autres tubes  
à essais ont été pris comme groupe d'essais et on leur  
a ajouté 50  $\mu$ l d'échantillon respectivement, puis on  
20 les a soumis à une préincubation dans l'obscurité  
pendant 30 minutes. Lorsque la préincubation était  
terminée, on a ajouté 0,5 ml d'une solution aqueuse de  
rose bengale (12  $\mu$ M) comme photosensibilisant, et les  
ouvertures ont été bouchées hermétiquement avec du  
25 para-film. Dans une boîte hexahédrique rectangulaire de  
50x20x25 cm, dont l'intérieur a été peint dans une  
couleur foncée et équipée d'une lampe fluorescente de  
20W, les tubes à essais ont été disposés à une distance  
de 5cm de la lampe et irradiés pendant 15min. Le but de  
30 l'addition du photosensibilisant et de l'irradiation  
par la lumière était de produire des espèces chimiques  
à oxygène actif.

Lorsque l'irradiation était terminée, les  
tubes à essais ont été maintenus à l'obscurité et les  
35 transmittances à 700nm ont été mesurées à des



intervalles de 15 minutes. A cette longueur d'onde, l'augmentation de transmittance de la suspension d'érythrocyte était proportionnelle à l'hémolyse des érythrocytes.

5                    Toutes les expériences décrites ci-dessus ont été effectuées à une température ambiante constante de 27°C, et les activités de protection des cellules des échantillons contre les espèces chimiques à oxygène actif ont été définies comme le temps de demi-hémolyse  
10                    (en minutes) nécessaire pour photohémolyser 50% des érythrocytes ajoutés dans les conditions ci-dessus.

### 3) Résultats

15                    Les résultats sont donnés dans le tableau 1 ci-dessous, qui montre que plusieurs flavonoïdes tels que galangine, EGCG etc. ont une activité supérieure à celle de l' $\alpha$ -tocophérol.

**Tableau 1 : Effet de protection des cellules des flavonoïdes contre les espèces chimiques à oxygène actif.**

|    |                  |                               |
|----|------------------|-------------------------------|
| 5  | -----            |                               |
|    | Echantillon      | Temps de demi-hémolyse (min.) |
|    | -----            |                               |
|    | galangine        | 1800                          |
|    | EGCG             | 400                           |
| 10 | quercétine       | 315                           |
|    | kaempférol       | 280                           |
|    | myricétine       | 160                           |
|    | baïcaléine       | 106                           |
|    | -----            |                               |
| 15 | fisétine         | 87                            |
|    | morine           | 55                            |
|    | 3-hydroxyflavone | 46                            |
|    | rutine           | 32                            |
|    | apigénine        | 51                            |
| 20 | chrysine         | 50                            |
|    | acacétine        | 45                            |
|    | baïcaline        | 32                            |
|    | flavone          | 25                            |
|    | 7,8-benzoflavone | 50                            |
| 25 | (-)-épicatechine | 42                            |
|    | (+)-catéchine    | 41                            |
|    | silybine         | 49                            |
|    | dihydorobinétine | 41                            |
|    | taxifoline       | 33                            |
| 30 | aromadendrine    | 33                            |
|    | -----            |                               |
|    | α-tocophérol     | 45                            |
|    | -----            |                               |
|    | témoin           | 32                            |

-----

**Essai 2 : Activité synergique de la galangine et de l'EGCG.**

5                    La galangine et l'EGCG ont été combinés dans  
le rapport molaire de 3:1-1:3 pour préparer des  
échantillons (4mM) et des mesures ont été effectuées de  
la même manière que dans l'essai 1. La comparaison des  
résultats avec ceux de l'essai 1 montre que la  
10 galangine et l'EGCG ont une nette activité synergique.

**Tableau 2 : Synergie de la galangine et de l'EGCG.**

| Echantillon           | Temps de demi-hémolyse (min.) |
|-----------------------|-------------------------------|
| galangine + EGCG(1:1) | >2000                         |
| galangine + EGCG(3:1) | >2000                         |
| galangine + EGCG(1:3) | >2000                         |
| galangine             | 1800                          |
| EGCG                  | 400                           |
| $\alpha$ -tocophérol  | 45                            |
| témoin                | 32                            |

**Exemples 1-6 :**

Préparation de la solution contenant  
l'extrait total.

30                    Pour 1,0 kg de matières végétales sèches  
obtenues à partir de feuilles de Camellia Sinensis L.,  
de racines d'Alpinia officinarum, de racines de  
Scutellaria baicalensis Georgi, de feuilles de Ginkgo  
biloba L., d'écorces de fruits de Citrus tangerina  
35 Hort. et de Tanaka et de feuilles d'Acacia catechu

Willd, on a ajouté 10kg d'éthanol à 50(V/V)% et, après avoir extrait le mélange à la température ambiante pendant 7 jours, on a ajouté 8,0 kg d'eau à la solution contenant l'extrait. La solution obtenue a été vieillie  
5 en chambre froide à 10°C et filtrée pour donner à chaque fois 16 kg de solution contenant l'extrait total.

Essai 3 :

10 Mesure de l'activité de protection des cellules de l'extrait total de matières végétales.

Cet essai a été effectué pour mesurer l'activité de protection des cellules des solutions contenant un extrait total obtenues dans les exemples 1 à 6.

15 L'essai a été effectué de la même manière que dans l'essai 1 excepté que les solutions diluées par l'éthanol (1- 10) de la solution contenant l'extrait total ont été utilisées comme échantillons.

20 Les résultats sont donnés dans le tableau 3 ci-dessous. D'après les résultats, on peut voir que les extraits totaux d'Alpinia et de Camellia contenant respectivement de la galangine et de l'EGCG présentent une excellente activité, et l'on estime que ces solutions peuvent être utilisées elles-mêmes comme  
25 agents de protection des cellules.

Tableau 3 : Activité de protection des cellules de l'extrait total

|    | Source d'extrait total | Temps de demi-hémolyse (min.) |
|----|------------------------|-------------------------------|
| 5  | -----                  | -----                         |
|    | Camellia               | 800                           |
|    | Alpinia                | 420                           |
|    | Scutellaria            | 290                           |
|    | -----                  | -----                         |
| 10 | Ginko                  | 55                            |
|    | Citrus                 | 38                            |
|    | Acacia                 | 42                            |
|    | -----                  | -----                         |
|    | Témoin                 | 32                            |
| 15 | -----                  | -----                         |

Exemple 7 :

Activité synergique dans l'extrait total obtenu à partir de Camellia et d'Alpinia

20 Des solutions contenant des extraits totaux obtenus à partir de feuilles de Camellia Sinensis L. et de racines d'Alpinia officinarum Hance respectivement, ont été combinées dans le rapport de 1:1 (en poids de base) et essayées de la même manière que dans l'essai 3. La mesure montre que le temps de demi-hémolyse est de 1200 min.

Exemple 8 :

Préparation d'un extrait purifié de Camellia Sinensis L.

30 A 1,0 kg de feuilles sèches de Camellia Sinensis L., on ajoute 10 kg d'eau et on extrait le mélange obtenu pendant deux heures à 80°C tout en chauffant, puis on concentre le filtrat à un volume de 1/5 à 50°C. On ajoute au concentré 5 kg d'éthanol et,

après avoir mélangé et filtré, on concentre le filtrat à sec à 50°C pour obtenir 80g d'extrait purifié contenant de l'EGCG.

Exemple 9 :

5                    Extraction de la galangine.

                  A 100g de racines sèches d'*Alpinia officinarum* Hance, on ajoute 1,0kg d'acétate d'éthyle. On chauffe le mélange obtenu sous reflux pendant 2 heures et, après refroidissement, on le filtre. On  
10 concentre le filtrat. On soumet le concentré à une chromatographie sur colonne avec du gel de silice (gel de silice 200g, diamètre de la colonne 4cm, n-hexane : acétate d'éthyle = 3:1(V/V)) pour obtenir les fractions contenant de la galangine, après quoi on les fait  
15 recristalliser dans un mélange de n-hexanol et d'acétate d'éthyle 1:1(V/V), ce qui donne 0,9g de galangine.

Exemple 10 :

20                   Préparation d'un agent de protection des cellules.

                  On dissout 8g de l'extrait purifié de *Camellia Sinensis* L. obtenu dans l'exemple 8 et 0,9g de la galangine obtenue à partir d'*Alpinia officinarum* Hance dans l'exemple 9 dans 1,6kg de la solution  
25 contenant l'extrait total obtenue à partir de *Scutellaria baicalensis* Georgi dans l'exemple 3 pour préparer l'agent de protection des cellules. L'agent de protection des cellules ainsi obtenu a été essayé de la même manière que dans l'essai 3, et la mesure a montré  
30 un temps de demi-hémolyse supérieur à 2000 min.

## REVENDECATIONS

1. Agent de protection des cellules contre les espèces chimiques à oxygène actif préparé à partir d'extraits totaux ou purifiés de matières végétales choisies parmi les feuilles de *Camellia sinensis* L., des racines d'*Alpinia officinarum* Hance et des racines de *Scutellaria baicalensis* Georgi qui contient au moins un flavonoïde biochimiquement actif constitué par du gallate de (-)-épigallocatechine, de la galangine ou de la baicaléine comme constituant actif.

2. Agent de protection des cellules suivant la revendication 1, dans lequel l'agent de protection des cellules est caractérisé en ce qu'il contient de la (-)-épigallocatechine et de la galangine dans le rapport molaire de 1:3 à 3:1.

3. Agent de protection des cellules suivant la revendication 1, caractérisé en ce qu'on combine la solution contenant l'extrait total de *Camellia sinensis* L. et la solution contenant l'extrait total de *Alpinia officinarum* Hance.

4. Agent de protection des cellules suivant la revendication 1, dans lequel l'agent de protection des cellules est préparé en dissolvant l'extrait purifié contenant du gallate de l'(-)-épigallocatechine obtenu à partir de *Camellia sinensis* L. et de la galangine extraite d'*Alpinia officinarum* Hance dans la solution contenant l'extrait total de *Scutellaria baicalensis* Georgi.

5. Procédé de préparation d'un agent de protection des cellules selon la revendication 1 qui est caractérisé en ce qu'on extrait les matières végétales avec de l'éthanol aqueux, en ce qu'on ajoute de l'eau à la solution contenant l'extrait dans les mêmes quantités et en ce qu'on fait vieillir le mélange obtenu.

5 6. Procédé de préparation de gallate de (-)-  
épigallocatechine qui est caractérisé en ce qu'on  
extraît les feuilles de *Camellia sinensis* L. avec de  
l'eau à raison de 10 fois leur poids à 80°C, en ce que,  
après filtration, on concentre le filtrat à un volume de  
1/5, en ce qu'on ajoute au concentré de l'éthanol à  
raison de trois fois son poids, en ce qu'on élimine le  
précipité par filtration et en ce qu'on concentre le  
filtrat à sec.

10 7. Procédé de préparation de la galangine qui  
est caractérisé en ce qu'on effectue une  
chromatographie sur colonne avec du gel de silice sur  
l'extrait par l'acétate d'éthyle d'*Alpinia officinarum*  
Hance pour obtenir des fractions contenant de la  
15 galangine, puis on recristallise les fractions dans un  
mélange hexane:acétate d'éthyle=1:1(V/V).

20 8. Composition cosmétique qui est  
caractérisée en ce qu'elle comprend un agent de  
protection des cellules comprenant au moins un flavonoï-  
de selon la revendication 1.